

雷公藤甲素对粘虫中肠消化酶及其组织结构的影响

罗都强, 秦建春, 张 兴

(西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 测试雷公藤甲素对粘虫中肠消化酶活性的影响, 并对中毒试虫的中肠组织结构进行显微观察。结果表明, 处理试虫脂肪酶活性在痉挛期和麻痹期分别下降 26.0% 和 39.1%, 达极显著水平; 淀粉酶、蛋白酶活性在各个时期的变化均不显著; 中肠细胞变厚且混乱变形, 组织许多部位呈消融状, 肠壁细胞层排列不规则, 柱状细胞与杯状细胞排列不整齐, 并有纵肌、微绒毛脱落现象。

[关键词] 雷公藤甲素; 中肠消化酶; 显微结构; 粘虫

[中图分类号] S482.39

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)06-057-04

雷公藤(*Triperterygium wilfordii* Hook)是我国一种传统的杀虫植物, 笔者等对其特异性杀虫作用进行了大量的研究, 并取得了很大的进展^[1-3]。雷公藤甲素是采用生物活性追踪的方法, 从杀虫植物雷公藤根皮中提取出来的二萜内酯杀虫活性物质, 并首次发现其具有触杀作用。试虫中毒后, 先表现为兴奋, 随之剧烈痉挛、扭动, 并伴随失水, 最后麻痹死亡。根据其中毒症状, 推测该化合物为一种特殊的神经毒剂, 同时也可能作用于消化系统。本研究从中肠消化酶和中肠组织结构两个方面对雷公藤甲素的触杀作用机理进行了初步研究, 旨在为生物合理设计、创制新型的杀虫剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

粘虫(*Mythimna separata*)为室内人工饲养的种群, 挑选蜕皮后的 5 龄幼虫供试。

1.2 供试药剂

从雷公藤根皮中分离得到的无色针状结晶, 经福建省医学科学研究所鉴定为雷公藤甲素, 纯度达 95% 以上。

1.3 试验方法

1.3.1 试虫处理 取 5 龄中期粘虫幼虫, 分对照组(CK)和处理组(TR), 处理组每头点滴 0.904 μ L 的 10 g/L 雷公藤甲素丙酮液, 对照点滴等量的丙酮。试虫出现兴奋期、痉挛期、麻痹期时, 从中挑选出不同时期的试虫备用。

1.3.2 酶液制备 取处理组兴奋期、痉挛期、麻痹期和对照组试虫各 20 头, 于冰柜中切取试虫中段(第 1 对胸足和第 3 对腹足之间), 在滤纸上小心用镊子拉出中肠, 用剪刀纵向剖开, 在生理盐水中洗去肠内食物并匀浆, 每条中肠加入体积分数 20% 的甘油 1 mL, 并于冰箱中 850 $\times$ g 下离心 20 min, 取上清液备用。

1.3.3 消化酶活性测定 蛋白质含量测定参照张翔龙^[4]等方法, 蛋白酶活性测定参照沙槎云等^[5]的方法, 淀粉酶活性测定参照施特尔马赫^[6]的方法, 脂肪酶活性测定参照刘维德等^[7]的方法。

1.3.4 试虫中肠半薄切片制作观察 取对照和兴奋、痉挛、麻痹 3 个时期的试虫在水浴中解剖出的中肠, 用 7 g/L 的生理盐水漂洗出食物残渣, 展开铺平, 在体积分数 4% 的戊二醛中低温条件下固定后, 切成大约 1 mm 边长的小块。缓冲液清洗干净后, 用体积分数 1% 的锇酸固定, 再用缓冲液将锇酸冲洗干净, 在体积分数为 10%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100% 的丙酮液中逐级脱水, 每级脱水各 20 min, 然后渗透和包埋(包埋剂体积比: IPON-812 DDSA NMA DMP₃₀ = 9 5 4 8 5 6 0 3)。分别在 35, 45, 60 $^{\circ}$ C 下各聚合 1 d, 半薄切片、染色后, 在光学显微镜下观察并照相。

2 结果与分析

2.1 对中肠淀粉酶活性的影响

试虫用雷公藤甲素点滴处理后, 不同时期体内

〔收稿日期〕 2001-07-09

〔基金项目〕 高等学校博士点基金资助项目(003518); 杨凌农业科技开发基金资助项目(98A19)

〔作者简介〕 罗都强(1965-), 男, 陕西扶风人, 讲师, 在读博士, 主要从事植物源农药研究。

中肠淀粉酶活性的测定结果(表 1)表明,雷公藤甲素作用于粘虫后,中肠淀粉酶在兴奋期升高13.4%,在痉挛期和麻痹期分别下降30.8%,39.8%。经方差分析, $F = 2.626 < F_{0.05} = 4.07$,未达到显著水平。

表 1 雷公藤甲素对粘虫中肠淀粉酶活性的影响

Table 1 Effect of trip tolide on the midgut amylase activity of <i>Mythimna separata</i> (Walker)							
处理 Treatment	样品中 蛋白质含量/ (g · L ⁻¹) The protein level	OD 值差 The difference of absorption coefficient				比活力/ (mg · mg ⁻¹ · min ⁻¹) The activity of amylase	抑制率/% Inhibition ratio
		I	II	III	平均 Average		
对照 Control	0.249	0.35	0.31	0.39	0.350	1.671	—
兴奋 Excitation	0.244	0.39	0.29	0.48	0.387	1.899	13.4*
痉挛 Spasm	0.228	0.27	0.34	0.32	0.313	1.616	30.8
麻痹 Paralysis	0.261	0.22	0.24	0.31	0.257	1.185	39.8

注: 回归方程: $y = -0.0012 + 0.4217x$ ($r = 0.9998$).
Note: The regression equation is: $y = -0.0012 + 0.4217x$ ($r = 0.9998$).

2.2 对 中 肠 脂 肪 酶 活 性 的 影 响
雷公藤甲素点滴处理后,试虫中肠脂肪酶活性的变化见表 2。从表 2 可以看出,试虫中毒后,与对照相比在兴奋期脂肪酶的活性下降 7.33%,在痉挛和麻痹期分别下降 26.0%,39.1%。方差分析表明,在痉挛和麻痹期脂肪酶活性差异与对照相比均达到极显著水平,而兴奋期与对照则处与同一水平。

表 2 雷公藤甲素对粘虫中肠脂肪酶活性的抑制效果

Table 2 Inhibition effect of trip tolide on the midgut lipase activity of <i>Mythimna separata</i> (Walker)				
处理 Treatment	比活力/ (μmol · mg ⁻¹ · min ⁻¹) The activity of lipase	抑制率/% Inhibition ratio	差异显著性 The significance of difference	
			5%	1%
对照 Control	0.0148 ± 0.0031	—	a	A
兴奋 Excitation	0.01375 ± 0.0026	7.3	a	A
痉挛 Spasm	0.01096 ± 0.0028	26.0	b	B
麻痹 Paralysis	0.009 ± 0.0014	29.1	c	C

2.3 对 试 虫 中 肠 蛋 白 酶 活 性 的 影 响
试虫经雷公藤甲素点滴处理后,不同时期内蛋白酶活性的测定结果见表 3。由表 3 可以看出,雷公藤甲素作用于粘虫后,无论是兴奋期,还是痉挛期和麻痹期,中肠蛋白酶的活性均比对照试虫有所降低,但方差分析结果表明,其差异均未达到显著水平。

表 3 雷公藤甲素对粘虫中肠蛋白酶活力的影响

Table 3 Effect of trip tolide on midgut protease of <i>Mythimna separata</i> (Walker)							
处理 Treatment	样品中 蛋白质含量/ (g · L ⁻¹) The protein level	OD 值差 The difference of absorption coefficient				比活力/ (μg · mg ⁻¹ · min ⁻¹) The activity of protease	抑制率/% Inhibition ratio
		I	II	III	平均 Average		
对照 Control	1.923	0.016	0.020	0.012	0.016	0.1572	—
兴奋 Excitation	1.222	0.016	0.012	0.011	0.013	0.1576	-0.3
痉挛 Spasm	1.699	0.010	0.013	0.015	0.012	0.1101	29.9
麻痹 Paralysis	1.767	0.011	0.012	0.011	0.011	0.0843	46.4

注: 回归方程 $y = 0.0076 + 0.00174x$ ($r = 0.932$).
Note: The regression equation is: $y = 0.0076 + 0.00174x$ ($r = 0.932$).

2.4 中 肠 组 织 切 片 观 察
显微观察发现,对照组试虫中肠细胞排列整齐,微绒毛完整有序(图版-1);兴奋期试虫中毒后中肠细胞逐步变厚且变形,微绒毛脱落(图版-2);痉挛期试虫中肠组织模糊不清,并且膨胀加厚,肠壁细胞层排列不规则,许多部位已呈消融状(图版-3);麻痹期中试虫

肠组织坏死, 微绒毛、纵肌几乎完全脱落 (图版-4)。

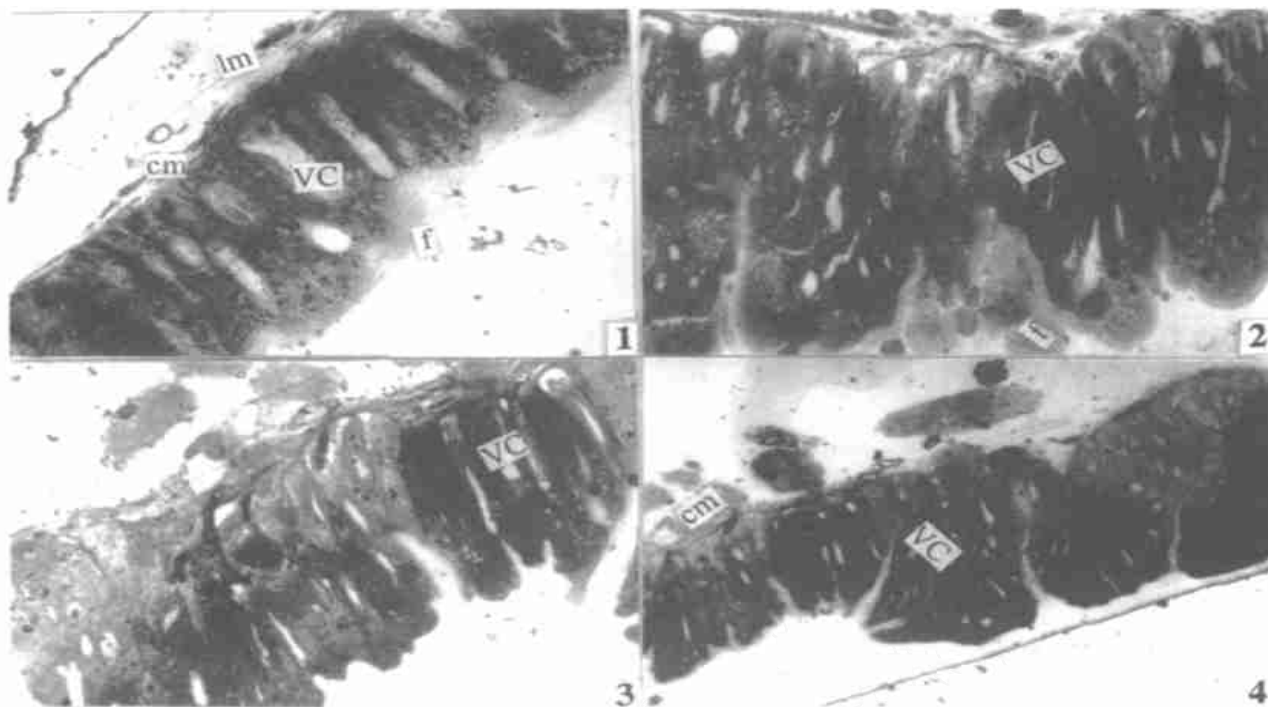


图1 雷公藤甲素中毒后粘虫五龄幼虫中肠组织变化情况

1. 对照 $\times 400$; 2. 兴奋期 $\times 400$; 3. 痉挛期 $\times 400$; 4. 瘫痪期 $\times 400$

(VC. 中肠细胞; lm. 纵肌; cm. 环肌; f. 微绒毛)

Fig 1 The pathological changes of the midgut tissue of the 5th instars larvae of *Mythimna separata* (Walker) after being treated by triptolide

1. Control $\times 400$; 2. The period of excitation $\times 400$; 3. The period of spasm $\times 400$; 4. The period of paralysis $\times 400$;

(VC. midgut cells; lm. vertical muscle; cm. ring muscle; f. microvilli)

观察结果表明, 雷公藤甲素对粘虫消化道的破坏作用很大, 是引起昆虫死亡的原因之一。这种作用可能是药剂对神经系统影响的后果之一, 也可能是药剂与受体结合, 导致细胞膜的构象发生变化, 位于细胞膜上的离子通道或质子泵被破坏, 细胞膜对离子的通透性发生改变, 渗透压的平衡被打破, 细胞膨胀、穿孔扩大, 最终细胞瓦解。

3 讨论

雷公藤甲素是作者通过系统的生物活性追踪方法, 从雷公藤根皮中首次分离出的具有杀虫活性的二萜内酯活性物质, 它具有触杀、胃毒、拒食等作用方式。点滴处理后, 试虫首先表现为兴奋, 继而痉挛、麻痹, 甚至死亡, 并伴有直肠或围食膜拉出。因此, 可初步认为, 雷公藤甲素的作用机理是引起神经中毒, 同时对消化系统有破坏作用。

1) 中肠消化酶可能不是雷公藤甲素的作用靶标。本研究结果表明, 处理试虫的脂肪酶在兴奋期与对照无差异, 痉挛期和麻痹期分别下降 26% 和 39.1%, 差异达到极显著水平; 而淀粉酶和蛋白酶在

个各时期虽有所差异, 但经方差分析均未达到显著水平。由于淀粉酶和蛋白酶是昆虫体内最重要的两个消化酶, 而脂肪酶并不是主要的消化酶, 其活性下降较大可能是由于其分泌量很少, 且本身活性不高。因此, 雷公藤甲素对中肠消化酶没有显著的影响, 消化酶活性的略微降低或升高不是造成昆虫死亡的原因。

昆虫中肠的主要功能是消化和吸收。昆虫取食后, 食物经过一定的咀嚼进入中肠。在中肠中有各种不同的消化酶, 各种消化酶协同作用, 如内肽酶将蛋白质分解为多肽, 然后在外肽酶的作用下分解为小肽和氨基酸, 再通过中肠细胞吸收^[8]。消化酶的活性与取食状态有关, 当饥饿时, 酶活性下降, 饥饿后再取食时, 酶的活性常常下降^[9], 这与本试验的结果基本一致。昆虫取食后, 食物及其他代谢物直接刺激中肠细胞而诱导酶的分泌, 这种调节作用受到神经和激素的调控。昆虫的伸展感受器接受前肠的膨胀刺激后, 即能刺激额神经节, 再传到大脑影响前肠释放出一种控制分泌的激素。粘虫消化酶的活性变化与肠壁细胞酶的合成及分泌有关^[9]。雷公藤甲素对消

化酶活性的抑制都在 50% 以下, 所以雷公藤甲素对消化酶的作用不可能是直接的抑制合成^[10]。酶的分泌是一种胞吐作用, 酶存在于小囊泡中, 小囊泡迁移到细胞微绒毛, 囊泡膜与微绒毛膜融合, 酶被释放出去^[11]。另外, 由于肠壁细胞膜的损伤, 大量细胞内液及血淋巴进入肠腔对消化酶起到稀释作用, 这也是酶活性下降的原因之一。至于脂肪酶活性下降较多的原因, 除了上述原因之外, 是否由于雷公藤甲素本身是一种多元酯, 对脂肪酶的活性有反馈抑制作用。而淀粉酶、蛋白酶下降较多的原因可能是由于试虫本身的饥饿状态, 而与药剂无关^[9]。

2) 雷公藤甲素对中肠肠壁组织的破坏可能是引起昆虫死亡的原因之一。中肠组织的显微结构观察发现, 中肠组织模糊不清, 整个组织膨胀加厚, 许多

部位呈消融状, 组织坏死, 柱状和杯状细胞排列不整齐, 并有纵肌和微绒毛脱落, 这说明雷公藤甲素对昆虫消化道有破坏作用。这种破坏作用与川楝对中肠的作用相似^[12], 可能是药剂对神经系统的影响, 也可能是药剂与受体结合, 导致细胞膜的构象发生变化, 位于细胞膜上的离子通道或质子泵被破坏, 细胞膜对离子的通透性发生改变, 渗透压的平衡被破坏, 细胞膨胀, 穿孔扩大, 最终细胞瓦解。加之取食量减少, 导致麻痹死亡。

雷公藤除对消化道有破坏作用外, 很有可能对神经系统有影响。因此, 需对神经系统的作用机理进一步研究。中肠组织的破坏是否为神经系统受到影响的后果之一, 尚需继续探讨。

[参考文献]

- [1] 罗都强, 张 兴 杀虫植物雷公藤研究进展[J]. 西北农业大学学报, 2000, 28(3): 84- 89
- [2] 罗都强, 张 兴 雷公藤非生物碱成分对菜青虫杀虫活性研究[J]. 农药学报, 2000, (4): 94- 96
- [3] 罗都强, 冯俊涛, 胡 瓚, 等 雷公藤生物碱分离及杀虫活性研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2001, 29(2): 61- 64
- [4] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛 生化实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1984
- [5] 沙棧云, 白 成, 温 洁 粘虫肠道蛋白酶在苏云金杆菌肯尼亚变种“7404”晶体致病中的作用[J]. 昆虫学报, 1981, 29(3): 237- 243
- [6] 施特尔马赫 B. 酶的测定方法[M]. 钱嘉渊译 北京: 轻工业出版社, 1992
- [7] 刘维德, 齐治欧 G P. 双硫磷诱导抗有机磷致乏库蚊脂酶活性的增强[J]. 昆虫学研究集刊, 1983, (3): 65- 72
- [8] Kerkut G A. Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology[M]. England: Pergamon press Oxford, 1985
- [9] 张宗炳 昆虫生理学及生物化学评述[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1964
- [10] Timmins W. A zadirachtin inhibits secretion of trypsin in midgut of *Manduca sexta* caterpillars: reduced growth due to impaired protein digestion [J]. Entomol Exp Appl, 1992, 63: 47- 45
- [11] Francisco J A. Soluble and membrane-bound forms of trypsin-like enzymes in *Musca domestica* larval midgut[J]. Insect Biochem Molec Biol, 1992, 22(7): 613- 619
- [12] 张 兴 川楝素制品对菜青虫生物活性的研究[D]. 广东广州: 华南农业大学, 1989

Effects of triptolide on the midgut tissue and the digestive enzyme activities of *Mythimna separata* (Walker) larvae

LUO Du-qiang, QIN Jian-chong, ZHANG Xing

(Biorational Pesticides Research and Service Center, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Triptolide isolated from the root bark of the plant *Tripterygium wilfordii* Hook is a insecticidal compound. The effects of triptolide on the midgut tissue and digestive enzyme activities of *Mythimna separata* larvae were determined by means of microscopy and biochemical analysis. It was observed that the midgut tissue of poisoned larvae exhibited distinct pathological changes. The results of biochemical analysis showed that the activities of protease, amylase of poisoned larval midgut had no significant changes compared with those of the normal larval midgut. It is thus suggested that triptolide might act on the midgut tissues.

Key words: triptolide; midgut digestive enzymes; microstructure; *Mythimna separata* (Walker)